云 南 植 物 研 究 2003，25（4）：491～496
Acta Botanica Yunnanica

利用核核糖体 DNA 内转录间隔区（ITS）探讨广义羽藓科系统发育*

张 会[1]，黄勤妮[1]，杜桂森[1]，吴鹏程[2]，刘 霞[1]**
（1 首都师范大学生物系，北京 100037；2 中国科学院植物研究所，北京 100093）

摘要：利用核核糖体 DNA ITS 序列，探讨了苔藓植物广义羽藓科的系统发育，摸索出适于扩增 ITS 片段的最适反应条件。实验共得到广义羽藓科 6 个种的 ITS 序列，它们分别是：*Abietinella abietina*（AJ417494），*Anomodon minor*（AJ344145），*Claopodium aciculum*（AJ315968），*Thuidium pristocalyx*（AJ416443），*Thuidium assimile*（AJ416442），*Herpetineuron toccoae*（AJ315967），其中后 5 个种是国际上首次得到的。本文利用 ITS 序列构建羽藓科 7 属、11 种植物的系统发育树，据 Bootstrap 严格一致树表明：广义的羽藓科为并系发育，可分为两个主要的分支，牛舌藓属 *Anomodon*，羊角藓属 *Herpetineuron* 和多枝藓属 *Haplohymenium* 等为一支，而山羽藓属 *Abietinella*，羽藓属 *Thuidium*，沼羽藓属 *Helodium* 和麻羽藓属 *Claopodium* 等为另一主要分支，从分子水平上支持了据形态特征把原牛舌藓亚科的牛舌藓属，羊角藓属，多枝藓属提升为牛舌藓科的结论。

关键词：羽藓科；系统发育；核核糖体 DNA；内转录间隔区（ITS）
中图分类号：Q 75，Q 949 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2003)04－0491－06

Using Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers（ITS）to Discuss the Phylogeny of Thuidiaceae（S.L.，Musci）

ZHANG Hui[1]，HUANG Qin-Ni[1]，DU Gui-Sen[1**]，WU Peng-Cheng[2]，LIU Xia[1]
（1 *Biology Department*，*Capital Normal University*，Beijing 100037，China；
2 *Institute of Botany*，*Academia Sinica*，Beijing 100093，China）

Abstract：In this paper，we analyzed the phylogenetic relationship of Thuidiaceae（s.l.，Musci）using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers（ITS），from which we got 6 species' ITS sequences of Thuidiaceae（s.l.），including *Abietinella abietina*（AJ417494），*Anomodon minor*（AJ344145），*Claopodium aciculum*（AJ315968），*Thuidium pristocalyx*（AJ416443），*Thuidium assimile*（AJ416442）and *Herpetineuron toccoae*（AJ315967），and then they were sequenced directly from PCR products. Among them，except *Abietinella abietina*，the other five species' ITS sequences are all the first time to be

* 基金项目：北京市自然科学基金资助项目
** 通讯作者
收稿日期：2002－12－23，2003－04－23 接受发表
作者简介：张会（1977－）女，硕士，现任北京陈经纶中学生物教师，本文是作者毕业论文的一部分。

reported in science. Finally we constructed the Bootstrap strict consensus trees of seven genera of Thuidiaceae (s.l.) which indicated that Thuidiaceae (s.l.) has two main paraphyletic clades, one including the genera *Anomodon*, *Herpetineuron*, *Haplohymenium et al*., and the another one including *Thuidium*, *Claopodium*, *Helodium et al*.

Key words: Thuidiaceae; Molecular phylogeny; Nuclear ribosomal DNA; Internal transcribed spacers

在藓类植物系统中，灰藓目为最大的一个目，其本身的系统关系较为复杂，如何科学的认识其内在系统关系，十分重要。羽藓科又是灰藓目中的一个大科，在世界广布，其系统位置介于薄罗藓科 Leskeaceae 和柳叶藓科 Amblystegiaceae 之间。1925 年 Brotherus 将羽藓科分为 4 个亚科：异枝藓亚科 Heterocladioideae、牛舌藓亚科 Anomodontoideae、羽藓亚科 Thuidioideae 和沼羽藓亚科 Helodioideae。这一系统基本上能反映羽藓科的亲缘关系。全世界范围内，广义羽藓科共有 14 属，311 种（辽宁省林业土壤研究所，1977）。在此基础上，吴鹏程等（2002）考虑植物体的外形、分枝形式、枝的尖端及叶细胞和鳞毛等性状，基本上同意 Crum、Anderson 及 Noguchi 等的观点，将麻羽藓属 *Claopodium* 和小羽藓属 *Haplocladium* 从牛舌藓亚科移入羽藓亚科，把山羽藓属 *Abietinella* 从羽藓亚科移至沼羽藓亚科，牛舌藓亚科其余的属则组成牛舌藓科 Anomodontaceae，这些见解主要是以形态解剖和分类学为依据。分子系统学的深入发展及其向植物分类学的渗透，极大的推动了植物分类学的发展。由于作为 DNA 基本单位的碱基具有相对稳定的变异速率和分支分析方法的引入，利用遗传物质 DNA 本身研究植物间的系统进化关系已成为植物分类学科的生长点之一（汪小全等，1997）。王艇等（2000）采用 PCR－RFLP 分析方法，分析了苔类和藓类植物 6 科的 9 种材料特异性扩增的 *rbc*L 基因的限制性内切酶酶切片段多态性，并用单联法对其遗传距离进行了聚类分析，对苔藓植物系统发育及系统位置作了初步探讨。Arikawa 等（1999）利用 *rbc*L 的核苷酸序列研究了棉藓科及其相近科的系统发育关系，共分析了 32 种藓类（38 个样品），有些种类不同的取材地点 *rbc*L 的核苷酸序列间有小的差异。Samigullin 等（1998）研究了 26 种苔藓植物的叶绿体 rDNA 的 cpITS2，cpITS3 和 cpITS4 序列的特征及其在系统学中的价值。Hyvoenen 等（1998）从形态特征和 *rbc*L，*rps*4 和核编码的 18S rRNA 基因着手，分析了金发藓目的所有属，还包括 8 种外类群，共 22 种。通过简约性分析得到系统树，结果表明金发藓目是一个明显的单系群，长台藓科（*Oedipodiaceae*）似乎是金发藓目（*Polytrichales*）的姐妹群。本论文从核核糖体 DNA 的 ITS 序列入手，在分子水平上初步探讨了广义羽藓科的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 植物材料

用于 DNA 提取的材料为新鲜或腊叶标本，详见表 1。

1.2 总 DNA 提取

采用 CTAB 法提取基因组 DNA，参照奥斯伯等（1998）的方法，并稍作改进，将 β－巯基乙醇浓度增加到 3%，经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后，如图 1 所示，进行 PCR 反应。

表 1　实验材料

Table 1　The materials of experiment

名称	采集地点	采集人	采集日期	采集编号	鉴定人
Thuidium assimile	河北雾灵山顶峰	张会、杜桂森	2001.06	2001030	吴鹏程
Abietinella abietina	河北雾灵山顶峰	张会、杜桂森	2001.06	2001033	吴鹏程
Anomodon minor	河北雾灵山顶峰	张会、杜桂森	2001.06	2001079	吴鹏程
Claopodium aciculum	云南贡山丙中洛	汪楣芝	1982.07	8917	吴鹏程
Thuidium pristocalyx	贵州荔波县月亮山	严亚玲	1991.05	890	吴鹏程
Herpetineuron toccoae	深圳市盐田	贾渝、朱大海	1997.10	3764	吴鹏程

1.3　PCR 反应

PCR 扩增采用 Takara 公司的 LA Taq with GC buffer，ITS－1 反应条件为：94℃预变性 1 min；循环反应（40 个循环）：94℃变性 30 s；55℃退火 30 s；72℃延伸 1 min；72℃最后延伸 5 min，4℃保存。ITS－2 的反应条件为：94℃预变性 1 min；循环反应（40 个循环）：94℃变性 30 s；50℃退火 30 s；72℃延伸 1 min；72℃最后延伸 5 min；4℃保存。扩增引物如下：ITS－1 扩增引物：K32247：5’ > GA CAC TCT AGC GGA AAT GCC < 3’；K31875：5’ > GCG GAA GGA TCA TTG CAC AC < 3’；ITS－2 扩增引物：K25722：5’ > CAA CTC TCA GCA ACG G < 3’；K25723：5’ > CTT TTC CGA TTA GAG GTC < 3’，其中 K32247 和 K25722 同时又分别作为 ITS－1 和 ITS－2 的测序引物。PCR 反应体系的组成，反应体积 50 μl，内含 2×GC buffer，25 μl；引物 1，0.5 μl；引物 2，0.5 μl；dNTPs，2 μl；模板，2 μl；LA Taq DNA 聚合酶，0.5 μl（2.5 U）；ddH_2O，19.5 μl。

1.4　琼脂糖凝胶电泳

PCR 扩增产物经 1.5%～2%琼脂糖凝胶电泳检测如图 2 所示，电泳 buffer 为 1×TAE。电泳结束后，直接用凝胶扫描仪扫描，并在紫外灯下切取 ITS 片段，再用 SK131Kit（上海生工生物工程有限公司）回收产物，纯化后由大连 Takara 公司测序。

1.5　数据分析

用 CLUSTAL X 进行同源性比较分析，然后用 PAUP4.0b4a（PPC）系统发育分析软件处理，构建系统树，采用 *Cratoneuron filicinum* 为外类群，共得到 34 棵系统树。

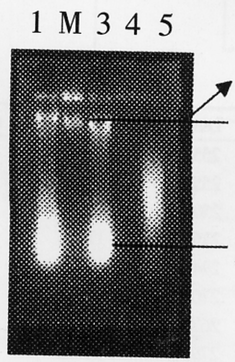

图 1　基因组 DNA 电泳图：1 为 *Thuidium assimile* 3，5 为 *Anomodon minor*，M 为 λDNA

Fig. 1　Electrophoresis of genomic DNA　1：Thuidium assimile；M：λDNA；3，5：Anomodon minor

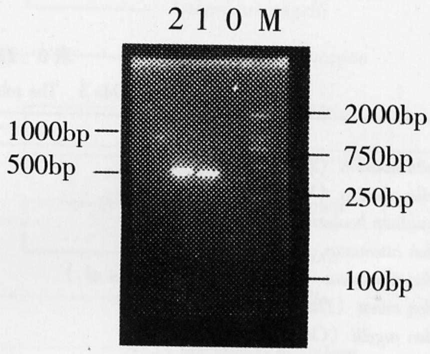

图 2　ITS 序列 PCR 产物电泳图，M 为 DL2000。

Fig. 2　Electrophoresis of ITS sequences' PCR products，M：DL2000 marker

2 结果与分析

实验共得到广义羽藓科 6 个种的 ITS 序列，它们分别是：*Abietinella abietina*（AJ417494），*Anomodon minor*（AJ344145），*Claopodium aciculum*（AJ315968），*Thuidium pristocalyx*（AJ416443），*Thuidium assimile*（AJ416442），*Herpetineuron toccoae*（AJ315967），其中后 5 个种是国际上首次得到的。将我们得到的序列连同网上下载的序列共同分析，发现羽藓科的 ITS 序列的长度变化情况为：ITS－1 长度为 249－277bp，ITS－2 长度为 242－288bp（表 2，表 3），均未超过 300bp。羽藓科种内 ITS－1 的 G＋C 含量和 ITS－2 序列的 G＋C 含量大体上是相似的（表 2，表 3），ITS－1 的 G＋C 含量为 62.35%～72.63%，ITS－2 的 G＋C 含量为 63.27%～69.52%。若只考虑内类群（ingroup），G＋C 含量最低的都是 *Anomodon attenuatus*，最高的都是 *Thuidium assimile*。这种间隔序列的相似性可能从某种程度上反映出 ITS－1 和 ITS－2 序列的趋同演化（coevolution）。

表 2　ITS－1 相关序列

Table 2　The related sequences of ITS－1

Taxa	GenBank No.	Length	GC content	GC percent/%
Abietinella abietina（Zhang，H. *et al*.）	AJ417494	259bp	174bp	67.18
Abietinella abietina（Vanderpoorten，A.）	AY009802	259bp	172bp	66.41
Anomodon attenuatus（Chiang，T. Y.）	AJ288419	263bp	165bp	62.74
Anomodon attenuatus（Vanderpoorten，A. *et al*.）	AF168133	262bp	163bp	62.21
Anomodon minor（Zhang，H. *et al*.）	AJ344145	264bp	166bp	62.88
Anomodon rugelii（Chiang，T. Y.）	AJ288420	263bp	165bp	62.74
Claopodium aciculum（Zhang，H. *et al*.）	AJ315968	277bp	177bp	63.90
Haplohymenium triste（Chiang，T. Y.）	AJ288424	257bp	161bp	62.65
Helodium blandowii（Chiang，T. Y.）	AJ288364	277bp	187bp	67.51
Helodium blandowii（Vanderpoorten，A.）	AY009803	255bp	167bp	65.49
Thuidium cymbifolium（Chiang，T. Y.）	AJ288417	255bp	159bp	62.35
Thuidium pristocalyx（Zhang，H.）	AJ416443	274bp	199bp	72.63
Thuidium assimile（Zhang，H.）	AJ416442	249bp	171bp	68.67
* *Cratoneuron filicinum*（Vanderpoorten，A. & Shaw，A.J.）	AF180949	266bp	168bp	63.16

注：带‘＊’的为外类群（outgroup）。

表 3　ITS－2 相关序列

Table 3　The related sequences of ITS－2

Taxa	GenBank No.	Length	GC content	GC percent/%
Abietinella abietina（Zhang，H.，*et al*.）	AJ417494	255bp	172bp	67.45
Abietinella abietina（Vanderpoorten，A.）	AY009802	255bp	172bp	67.45
Actinothuidium hookeri（Chiang，T. Y.）	AJ277228	250bp	162bp	64.80
Anomodon attenuatus（Chiang，T. Y.）	AJ277231	275bp	174bp	63.27
Anomodon attenuatus（Vanderpoorten，A.，*et al*.）	AF168133	274bp	177bp	64.60
Anomodon minor（Zhang，H.，*et al*.）	AJ344145	270bp	176bp	65.19
Anomodon rugelii（Chiang，T. Y.）	AJ277232	267bp	172bp	64.42
Claopodium aciculum（Zhang，H.，*et al*.）	AJ315968	279bp	187bp	67.03
Haplohymenium triste（Chiang，T. Y.）	AJ277236	242bp	161bp	66.53
Helodium blandowii（Chiang，T. Y.）	AJ288578	252bp	167bp	66.27
Herpetineuron toccoae（Zhang，H.，*et al*.）	AJ315967	288bp	195bp	67.71
Thuidium assimile（Zhang，H.，*et al*.）	AJ416442	263bp	179bp	68.06
* *Cratoneuron filicinum*（Vanderpoorten，A. & Shaw，A. J.）	AF180949	269bp	187bp	69.52

注：带‘＊’的为外类群（outgroup）。

将表2和表3中有关序列用 clustal X（1.8）软件进行同源性比较分析，并利用PAUP4.0b4a（PPC）软件构建系统树（图3，图4），空位被处理为缺如。

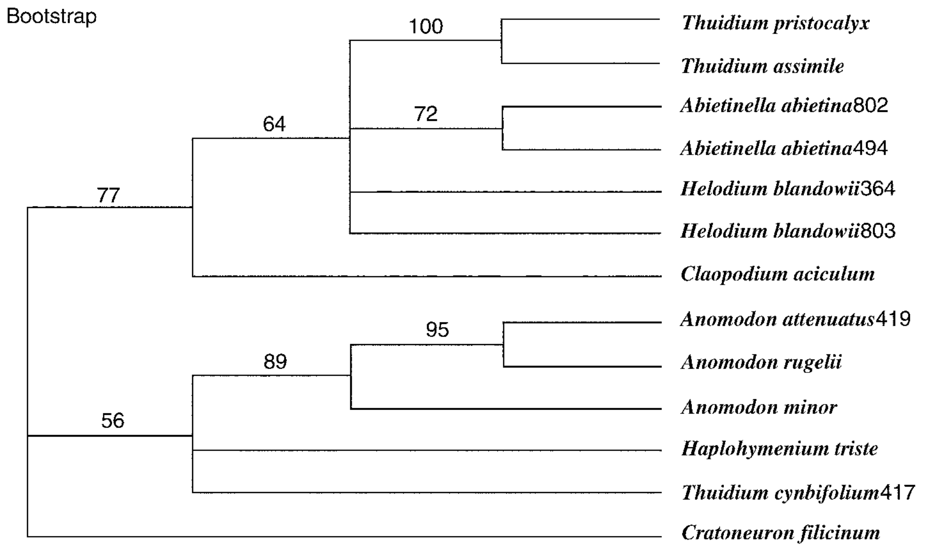

图3　据ITS－1序列数据（13种，344bp）构建的严格一致树

Fig. 3　Strict consensus tree of Thuidiaceae（Leskeinales，Hypnobryales）deduced from ITS－1 sequence data（13 taxa，344bp）. Bootstrap values（% of 100 replicates）50% or higher are plotted above the branch. Values are calculated by maximum parsimony method. *Cratoneuron filicinum* was used as outgroup.

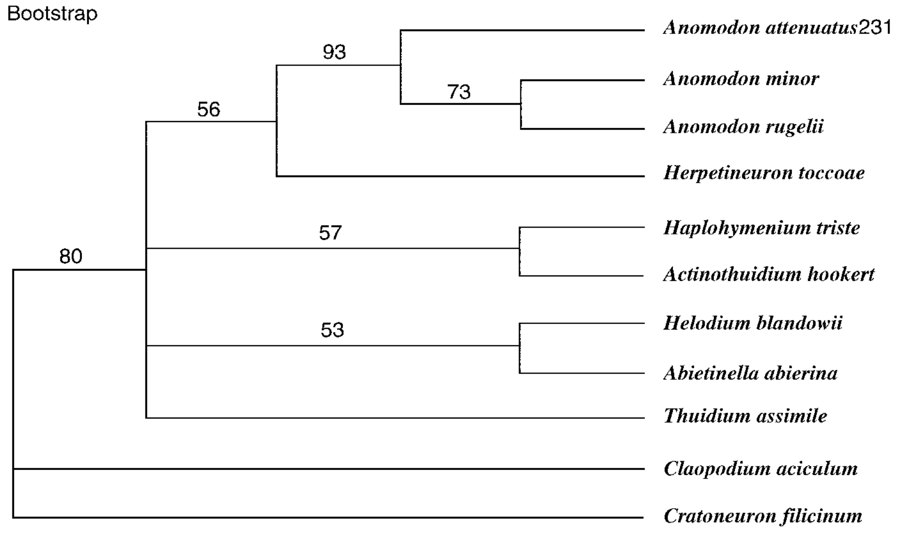

图4　据ITS－2序列数据（11种，334bp）构建的严格一致树

Fig. 4　Strict consensus tree of Thuidiaceae（Leskeinales，Hypnobryales）deduced from ITS－2 sequence data（11 taxa，334bp）. Bootstrap values（% of 100 replicates）50% or higher are plotted above the branch. Values are calculated by maximum parsimony method. *Cratoneuron filicinum* was used as outgroup.

从形态上观察，狭义羽藓科大部分为规则羽状分枝，而牛舌藓亚科以不规则分枝为主，少数为不规则羽状分枝；羽藓科鳞毛通常存在，有时密被，而牛舌藓亚科鳞毛多缺失；牛舌藓亚科茎叶与枝叶近似或近于同形，羽藓科茎叶与枝叶多异形；牛舌藓亚科雌雄同株或异株，而羽藓科为雌雄同株异苞或同苞。依据这些特征吴鹏程等（2002）同意把原牛舌藓亚科的羊角藓属、瓦叶藓属、牛舌藓属和多枝藓属单独列为一个科，与羽藓科处于对等的系统位置。我们用测得的 5 种广义羽藓科的 ITS 序列：*Anomodon minor*（AJ344145），*Claopodium aciculum*（AJ315968），*Thuidium pristocalyx*（AJ416443），*Thuidium assimile*（AJ416442）和 *Herpetineuron toccoae*（AJ315967），构建的系统树（图 3、4）表明，广义羽藓科明显的分为两大支，羽藓属、山羽藓属、沼羽藓属、麻羽藓属等为一分支，组成狭义的羽藓科；牛舌藓属，多枝藓属等为另一分支，基本上肯定原牛舌藓亚科的牛舌藓属、羊角藓属和多枝藓属与广义羽藓科其它属分离成为一个独立的科牛舌藓科，这和传统的形态学分类相一致。

总之，本项工作系国内首次将 ITS 序列用于探讨苔藓植物的系统发育关系，并且用 ITS 序列探讨羽藓科的系统发育关系，国际上在这方面虽有人做过相关研究，但未见有正式报道。对于羽藓属大羽藓 *Thuidium cymbifolium* 存在的问题，我们正在进一步研究。

致谢　衷心感谢中国科学院植物研究所汪湄芝高级实验师，汪小全研究员，魏晓新博士，孙映雪老师对本实验进行过程中提供的悉心指导和帮助。

〔参 考 文 献〕

辽宁省林业土壤研究所，1977. 东北藓类植物志［M］. 北京：科学出版社，234—266

吴鹏程主编，2002. 中国苔藓志第 6 卷［M］. 北京：科学出版社，167—270

奥斯伯 F，金斯顿 RE，塞德曼 JG 等，颜子颖，王海林译，金冬雁校，1998. 精编分子生物学实验指南［M］. 北京：科学出版社

Arikawa T，Higuchi M，1999. Phylogenetic analysis of the Plagiotheciaceae（Musci）and its relatives based on *rbc*L gene sequences［J］. *Cryptogamie Bryology*，**20**（4）：231—245

Hyvoenen J，Terry AH，Gary LS，*et al*，1998. On phylogeny of the Polytrichales［J］. *The Bryologist*，**101**（4）：489—504

Samigullin TH，Karmen MV，Aleksey VT，*et al*，1998. Sequences of rDNA internal transcribed spacers from the chloroplast DNA of 26 bryophytes：properties and phylogenetic utility［J］. *FEBS Letters*，**422**：47—51

Wang T（王艇），Zhu JM（朱建明），Su YJ（苏应娟），*et al*，2000. PCR-RFLP analysis of *rbc*L gene in some bryophyte［J］. *Acta Bot Boreal-occident Sin*（西北植物学报），**20**（6）：968—973

Wang XQ（汪小全），Han Y（韩英），Deng ZR（邓峥嵘），*et al*，1997. Phylogeny of the Pinaceae evidenced by molecular biology［J］. *Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**35**（2）：97—106